N° 13. **R. Weber,** Bern und **E. J. Boell,** New Haven. — Über die Cytochromoxydaseaktivität der Mitochondrien von frühen Entwicklungsstadien des Krallenfrosches *(Xenopus laevis* Daud.*)*. (Mit 3 Textabbildungen).[1]

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bern und dem Osborn Zoological Laboratory Yale University).

1. Einleitung.

Gewebezellen können mechanisch so zerkleinert werden, dass die verschiedenen Zellbestandteile erhalten bleiben. Solche in „physiologischen Medien" suspendierte Gewebe- bzw. Zellhomogenate lassen sich durch „differentielle Zentrifugierung" in relativ reine Fraktionen von Zellkernen, Mitochondrien und submikroskopischen Cytoplasmapartikeln zerlegen. Diese Methode gestattet, die chemische Beschaffenheit von Zellstrukturen direkt zu erfassen und ihre Funktionen im Zellgefüge experimentell zu erschliessen.

Bei den bisher am besten untersuchten Geweben von adulten Säugetieren zeichnet sich die Fraktion der grossen Cytoplasmapartikel, der Mitochondrien, gegenüber denen von anderen Zellbestandteilen durch ihren Reichtum an Fermenten aus (siehe z. B. Schneider 1953, Lang & Siebert 1954). Diese Strukturen enthalten u. a. die Fermentsysteme der biologischen Oxydation (z. B. Cytochromoxydase, Succinodehydrase) und diejenigen, welche zur Bildung der energiereichen Phosphatverbindungen notwendig sind. Damit ist bereits die zentrale Bedeutung der Mitochondrien im Stoffwechsel von differenzierten Gewebezellen angedeutet.

Weniger bekannt hingegen ist die Verteilung dieser wichtigen Fermente in embryonalen Zellen. Cytochromoxydase wird einerseits als an Granula gebunden erwähnt (Recknagel 1950) und andererseits aber auch als im Cytoplasma gelöst vermutet (Deutsch & Gustafson 1952). Da zur Deutung entwicklungsphysiologischer Befunde in vermehrtem Masse die Frage nach der Bedeutung der

[1] Diese Arbeit wurde ausgeführt mit Unterstützung der "*Janggen-Pöhn-Stiftung*" (R W) sowie eines „*Fulbright-Forschungs-Stipendiums*" (EJB).

physiologisch aktiven Cytoplasmapartikel aufgeworfen wurde (Lehmann & Wahli 1954, Gustafson & Hasselberg 1951), zeichnet sich das Problem der biochemischen Eigenschaften dieser Strukturen in embryonalen Zellen immer deutlicher ab.

Im folgenden werden einige quantitative Befunde über das Vorkommen der Cytochromoxydase sowie ihre Beziehung zu den Mitochondrien im Laufe der Entwicklung des Krallenfrosches (*Xenopus laevis* Daud.) mitgeteilt. Es sollte zunächst die Frage abgeklärt werden, ob dieses Ferment in embryonalen Zellen an bestimmte Strukturen gebunden oder in gelöster Form vorkommt. Ferner war zu untersuchen, in welcher Weise die im Laufe der Embryonalentwicklung beobachtete Zunahme der Fermentaktivität (Boell 1948) mit der Vermehrung der Mitochondrienpopulation verknüpft ist.

2. Ergebnisse und Diskussion. [1]

2.1. Die Verteilung der Cytochromoxydase im unbefruchteten Ei: Aus Homogenaten von Ovarialeiern konnte ohne weiteres nach Abtrennung der Dotter- und Pigmentgranula eine Mitochondrienfraktion auszentrifugiert werden. Bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop findet man in dieser Suspension zahlreiche, sich rasch bewegende Granula. In Abbildung 1 sind ein paar typische Formen von Mitochondrien aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen [2] zusammengestellt. Man erkennt, dass es sich dabei um eine morphologisch einheitliche Partikelpopulation (0,5—1,5 μ) handelt.

Die Aktivität der Cytochromoxydase wurde manometrisch mit Hilfe des „Cartesianischen Tauchers“ bestimmt, wobei die Intensität der Oxydation — gemessen als O_2-Aufnahme/Zeiteinheit — eines bekannten Substrates (*p*-Phenylen-diamin 0,04 m + Cytochrom *c* 5×10^{-4} m: Endkonzentrationen) ein Mass für den Fermentgehalt der untersuchten Partikelfraktion darstellt.

Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass die relative Cytochromoxydaseaktivität der Mitochondrien alle andern Fraktionen

---

[1] Einzelheiten über die Versuchstechnik, siehe Boell & Weber (1955)

[2] Die EM-Aufnahmen wurden im Chemischen Institut der Universität Bern mit dem Trüb-Täuber Elektronenmikroskop gemacht. Wir danken Frau Y. Roulet für ihre Hilfe.

um ein Mehrfaches übertrifft. Die Pigmentgranula und auch die submikroskopischen Partikel weisen geringe Anteile auf, die sich ohne weiteres als Verunreinigungen durch mitgeschleppte Mitochondrien erklären lassen. Da in der Mitochondrienfraktion allein nur 60% der Aktivität des Totalhomogenates gemessen wurden, könnte man vermuten, dass ein beträchtlicher Anteil des

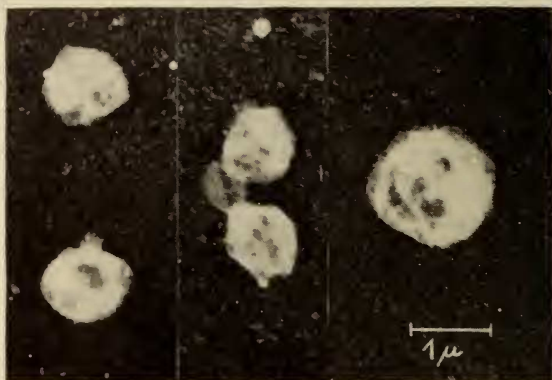


ABB. 1.
Mitochondrien aus unbefruchteten Eiern.
Suspendiert in 0,28 m Saccharose + 0,012 m Phosphatpuffer pH = 7,4 + 10^{-4} m Komplexon III, fixiert mit 2% Osmiumtetroxyd. Gold-manganin beschattet (1: 4).

TABELLE 1.
Verteilung von Stickstoff und Cytochromoxydase im unbefruchteten Ei.

Fraktion	Gesamt-N		Cytochromoxydase		
	μg	%	sp. Akt. 1	Total 2	%
Homogenat . . .	35.60	(100)	112	3950	(100)
Dotter	24.40	68	—	—	—
Pigment	1.14	3.2	228	260	6
Mitochondrien . .	2.10	5.9	1120	2350	60
Mikros.-Hyalopl. .	4.75	13.3	58	275	7
Waschmedium . .	2.65	7.4	—	—	—
Total	35.04	*97.8*	—	2885	*73*

1) 1) × 10^{-3} μl O_2/h μg N (= spezifische Aktivität).
2) × 10^{-3} μl O_2/h (= Totalaktivität).

Fermentes ausserhalb der Mitochondrien vorkommt. Wir glauben jedoch diese Möglichkeit ausschliessen zu dürfen; denn immer fanden wir für Partikelfraktionen ohne Mitochondrien keine grösseren Anteile als 7% der Totalaktivität. Ferner ist noch das Defizit von 27% zu erörtern, das resultiert, wenn man die Summe

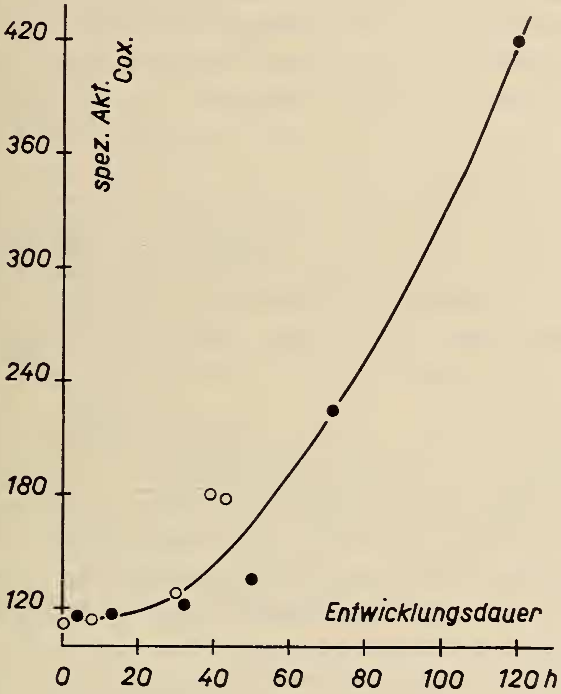


Abb. 2.

Cytochromoxydaseaktivität in Totalhomogenaten von Entwicklungsstadien
Die *Ordinate* gibt die spezifische Aktivität ($\times 10^{-3}$ µl O_2/h µg N), die *Abszisse* die Entwicklungsdauer in *h* bei 18° C. ● und ○ bedeuten Stadien von zwei verschiedenen Gelegen.

der Fraktionen mit der Aktivität des Totalhomogenats (100%) vergleicht. Dafür können Faktoren stofflicher Art verantwortlich gemacht werden, die nur im Totalhomogenat, nicht aber in den isolierten Fraktionen, synergistische Wirkungen (erhöhte Aktivität) entfalten oder aber, wie ein Blick auf die Stickstoffbilanz zeigt, der Verlust an Mitochondrien während der Fraktionierung.

Wir kommen somit zum Ergebnis, dass die Cytochromoxydase schon im unbefruchteten Ei an 0,5—ca. 1,5 μ grosse Granula gebunden ist; diese müssen auf Grund von morphologischen Kriterien als Mitochondrien bezeichnet werden. Zu ähnlichen Folgerungen gelangte RECKNAGEL (l. c.) für Ovarialeier von *Rana pipiens*. In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass Succinodehydrase bei geringerer Aktivität ein qualitativ gleiches Verhalten zeigt, hingegen Proteinase (pH = 4,8) zu ca. 80% im Cytoplasma gelöst vorkommt.

2. 2. Die Cytochromoxydaseaktivität in Mitochondrien von Entwicklungsstadien: In diesen Versuchen wurden jeweilen nur die Aktivitäten von Totalhomogenaten und den entsprechenden Mitochondrienfraktionen verglichen; sie umfassen Embryonalstadien sowie Junglarven vor der Aufnahme von Nahrung. Im Durchschnitt ergaben diese Mitochondrien eine höhere Aktivität als die von unbefruchteten Eiern, nämlich ca. 70% der für das Totalhomogenat gemessenen Aktivität.

In Abbildung 2 ist die Cytochromoxydaseaktivität/μg Stickstoff (spezifische Aktivität) in Abhängigkeit von der Entwicklungsdauer der Stadien (18° C) aufgetragen. Während der untersuchten Entwicklungsperiode ändert sich der Stickstoffgehalt der Keime bzw. Junglarven kaum, da in dieser Phase des „embryonalen Wachstums" nur Dottersubstanz in aktives Cytoplasma übergeführt wird. Dieser Vorgang kommt nun auch in der Zunahme der Cytochromoxydaseaktivität zum Ausdruck, wobei zu beachten ist, dass die entsprechende Kurve angenähert exponentiell ansteigt. Dieses Verhalten stimmt überein mit Befunden an *Amblystoma punctatum* (BOELL l. c.), steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von SPIEGELMAN & STEINBACH (1945), die für *Rana pipiens* eine unveränderte Cytochromoxydaseaktivität während der Entwicklung beschrieben.

Betrachtet man nun die Mitochondrien als uniforme Struktureinheiten mit konstanten Gehalt an Cytochromoxydase, so wäre die angenähert exponentiell verlaufende Aktivitätszunahme einfach dadurch zu erklären, dass die Fermentträger (Mitochondrien) mit gleichbleibender Vermehrungsrate an Zahl zunehmen. Aus dem anfänglich flachen Verlauf der Kurve (Abb. 2) geht jedoch deutlich

hervor, dass die Vermehrungsrate der Mitochondrien kleiner ist als die Zellteilungsrate. In der Frühentwicklung (Furchung) ist daher eine Abnahme der Mitochondrien/Zelle zu erwarten.

Entgegen unserer Erwartung eines konstanten Fermentgehaltes in der Mitochondrienpopulation fanden wir, wie Abbildung 3 zeigt, dass sich die spezifische Aktivität der Mitochondrien im Verlaufe der Entwicklung erheblich verändert, indem der relative

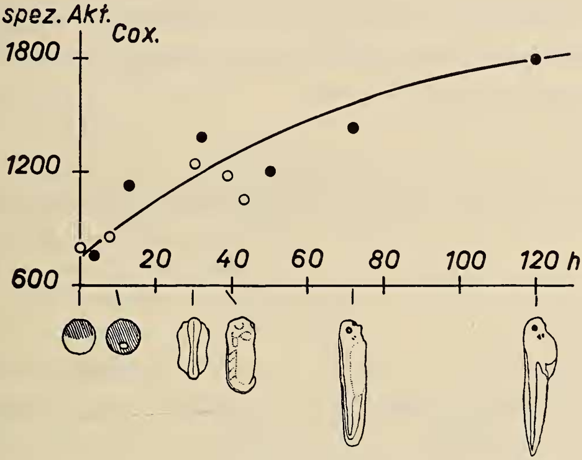


Abb. 3.
Cytochromoxydaseaktivität der Mitochondrienfraktion von Entwicklungsstadien.
Siehe Erklärung in Abb. 2.

Anteil an aktivem Ferment in der Mitochondrienpopulation allmählich zunimmt.

Dieses Ergebnis erlaubt eine weitergehende Deutung der in Abbildung 2 dargestellten Aktivitätszunahme in Totalhomogenaten und zwar in dem Sinne, dass mit einer Vermehrung der Mitochondriensubstanz auch noch eine „Differenzierung“ dieser Partikelpopulation, die sich als relative Zunahme des katalytisch aktiven Anteils äussert, einhergeht.

Wir möchten mit allem Nachdruck darauf hinweisen, dass wir die Frage, worauf dieser „Differenzierungsvorgang“ zurückzuführen ist, noch offen lassen müssen. Trotzdem möchten wir aber noch andeuten, welche Möglichkeiten für eine Erklärung dieser Erscheinung in Frage kommen könnten: 1. Könnte es sich einfach

darum handeln, dass im Laufe der Entwicklung bei konstantem Fermentanteil inerter Stickstoff aus der Mitochondrienfraktion verschwindet. Dagegen sprechen aber die hochgradige Konstanz der N-Werte besonders der frühen Stadien (Tabelle 2). 2. Auch Verschiebungen in der relativen Zusammensetzung der Mitochondrienpopulation, bedingt durch differentielles Wachstum der embryonalen Gewebe, könnten zu einem Überwiegen von Mitochondrien mit hoher spezifischer Aktivität führen. 3. Besteht die Möglichkeit, dass eine ursprünglich homogene Mitochondrienpopulation eine Art „Reifungsphase" durchläuft, wobei in diesen Struktureinheiten selbst katalytisch inaktives Protein in Cytochromoxydase übergeführt wird.

Tabelle 2.
Stickstoff-Gehalt der Mitochondrienfraktion für Entwicklungsstadien.

Alter 18° C	N-Gehalt/Keim bzw. Larve (Durchschnittswerte)	
	µg N	% des Total-N
Unbefruchtet . .	2.2	6.0
4—30 h	3.0	6.5
32—50 h	3.1	6.3
72 h	3.7	8.5
120 h	4.8	12.0

3. *Schlussbetrachtung.*

Wir können unsere Ergebnisse dahin zusammenfassen, dass im unbefruchteten Ei und in den Entwicklungsstadien bis zur Junglarve (vor Beginn der Futteraufnahme) von *Xenopus* die Cytochromoxydase an morphologisch definierte Granula, die Mitochondrien, gebunden ist. Es entsprechen also diese embryonalen bzw. erst in Differenzierung begriffenen Gewebe in dieser Hinsicht denjenigen von adulten Säugetieren (Schneider l. c., Lang & Siebert l. c.). Dass Cytochromoxydase im Hyaloplasma gelöst vorkommt, wie es Deutsch & Gustafson (l. c.) für Frühstadien von Seeigelkeimen annehmen, ist jedenfalls für *Xenopus* auszuschliessen.

Die im Verlaufe der Entwicklung beobachtete Zunahme der Cytochromoxydaseaktivität resultiert teils aus der Vermehrung der Mitochondrienpopulation, teils aber auch aus einer „Differenzierung“ derselben im Sinne einer relativen Zunahme der katalytisch aktiven Substanz. Obwohl die Bedingtheit dieses Differenzierungsvorganges noch unbekannt ist, so glauben wir doch ein gutes Argument dafür zu besitzen, dass den Mitochondrien, vom cytochemischem Standpunkt aus betrachtet, eine „Reifungsphase“ eigen ist. Dass diese Phase gerade mit den für die Frühentwicklung charakteristischen intensiven Stoffumwandlungen zusammenfällt, ermutigt zu weiteren Experimenten, um die möglichen Zusammenhänge aufzuklären.

Diese Arbeit wurde am Carlsberg Laboratorium in Kopenhagen ausgeführt. Wir möchten Herrn Prof. K. Linderstrøm-Lang und Herrn Dr. Heinz Holter herzlich danken für ihr Interesse an unseren Untersuchungen und auch dafür, dass uns alle Hilfsmittel des Laboratoriums zur Verfügung gestellt wurden.

Summary.

Results are presented on the occurrence of cytochrome oxidase in homogenates and isolated mitochondria of developing stages of *Xenopus laevis*. Cytochrome oxidase activity increases in successive stages throughout the prefeeding period of development. At all stages tested, the enzyme is concentrated in the mitochondria fraction of the homogenates. During development, the specific activity of the mitochondrial fraction (on a protein nitrogen base) shows a substantial increase.

LITERATUR

Boell, E. J. 1948. *Biochemical differentiation during amphibian development.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 49: 773.

— & R. Weber. 1955. *Cytochrome oxidase activity in mitochondria during amphibian development.* Exper. Cell. Res. (im Druck).

Deutsch, H. & T. Gustafson. 1952. *The changes in catalase and cytochrome oxidase activity in developing sea urchin eggs.* Arkiv Kemi 4: 221.

Gustafson, T. & I. Hasselberg. 1951. *Studies on enzymes in the developing sea urchin egg.* Exper. Cell Res. 2: 642.

LANG, K. & G. SIEBERT. 1954. *Die chemischen Leistungen der morphologischen Zellelemente.* In „Physiologische Chemie“ (B. FLASCHENTRÄGER & E. LEHNARTZ), II, 1064, Berlin, Göttingen und Heidelberg.

LEHMANN, F. E. & H. R. WAHLI. 1954. *Histochemische und elektronenmikroskopische Unterschiede im Cytoplasma der beiden Somatoblasten des Tubifexkeimes.* Z. Zellforsch. 39: 618.

RECKNAGEL, R. O. 1950. *Localisation of cytochrome oxidase on the mitochondria in the frog egg.* J. cell. and comp. Physiol. 35: 111.

SCHNEIDER, W. C. 1953. *Biochemical constitution of mammalian mitochondria.* J. Histochem. and Cytochem. 1: 212.

SPIEGELMAN, S. & H. B. STEINBACH. 1945. *Substrate-enzyme orientation during embryonic development.* Biol. Bull. 88: 254.

N° 14. **Th. Lender,** Strasbourg. — Mise en évidence et propriétés de l'organisine de la régénération des yeux chez la Planaire *Polycelis nigra.*

(Laboratoire de Zoologie et d'Embryologie expérimentale de la Faculté des Sciences de Strasbourg et du C.N.R.S., directeur M. Et. WOLFF).

Depuis les travaux de SANTOS (1929-1931), nous savons que des phénomènes d'induction interviennent dans la régénération du pharynx des planaires. Or l'étude des conditions de la régénération des yeux de la planaire *Polycelis nigra* a permis, à Et. Wolff et à moi-même, de mettre en évidence une autre activité inductrice (WOLFF et LENDER 1950). Nous avons montré, en effet, que le cerveau induisait à distance la régénération des yeux de *Polycelis nigra.* Les expériences faites pour préciser la nature de cette induction (LENDER 1952) ont suggéré l'hypothèse que le cerveau devait sécréter des substances chimiques, des organisines, capables de provoquer à distance la différenciation des ocelles. C'est la vérification de cette hypothèse qui m'a amené à faire les recherches suivantes.